



PCT/FR00/02336

RLOD 03 OCT 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

4

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **11 SEP. 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INPIINSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa

N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 6 DEC 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
LIEU 75 INPI PARIS		CABINET ORES	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 9915342		6 AVENUE DE MESSINE	
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 06 DEC. 1999		75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) CAclgF644/46bis			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date ____/____/____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) FONCTIONNALISATION D'UN PEPTIDE PAR UN GROUPEMENT α -HYDRAZINOACETIQUE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation FRANCE Date 19 / 08 / 1999 N° FR 9910626 Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT PASTEUR DE LILLE	
Prénoms			
Forme juridique		ETABLISSEMENT PUBLIC	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	1 RUE DU PROFESSEUR CALMETTE BP 245	
	Code postal et ville	59019 LILLE CEDEX	
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMIS DE PRES 6 DEC 1999 <small>Réservé à l'INPI</small> DATE 75 INPI PARIS LIEU			
N° D'ENREGISTREMENT 9915342 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI			
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		CAclgF644/46bis	
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	6 AVENUE DE MESSINE	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.45.62.75.00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.62.04.86	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i> :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1/1	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

REMISE DE L'ÉCRIT DATE 6 DEC 1999 LIEU 75-INPI-PARIS		Réservé à l'INPI	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		9915342	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire			
DB 829 W / 260899			
Vos références pour ce dossier (facultatif)		CAclg644/46bisFR	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ DU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation FRANCE Date 19 / 08 / 1999 N° FR 9910626 Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N°	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS	
Prénoms			
Forme juridique		ETABLISSEMENT PUBLIC	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	3 rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	75794	PARIS CEDEX 16
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Pays			
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

ORES Béatrice
(n°92-4046)

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

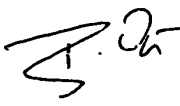
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CAclg644/46bisFR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		9115 342	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) FONCTIONNALISATION D'UN PEPTIDE PAR UN GROUPEMENT α -HYDRAZINOACETIQUE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT PASTEUR DE LILLE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BONNET	
Prénoms		Dominique	
Adresse	Rue	83 avenue Marx Dormoy	
	Code postal et ville	59000	LILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MELNYK	
Prénoms		Oleg	
Adresse	Rue	9 rue Gabriel Péri	
	Code postal et ville	59370	MONS EN BAROEUL
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GRAS-MASSE	
Prénoms		Hélène	
Adresse	Rue	321, la Rosière	
	Code postal et ville	59710	MERIGNIES
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		<p>Paris, le 6 décembre 1999</p> <p></p> <p>ORES Béatrice (n°92-4046)</p>	

FONCTIONNALISATION D'UN PEPTIDE PAR UN GROUPEMENT α -HYDRAZINOACETIQUE.

La présente invention est relative à un procédé de couplage en phase homogène entre un peptide et au moins un composé portant une fonction acide
5 carboxylique ou alcool, tel qu'un lipide, un sucre, un alcool ou un marqueur de fluorescence, ainsi qu'à des peptides modifiés qui sont essentiellement constitués d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un composé tel que défini ci-dessus.

La présente invention est également relative à l'utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique ou de l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique pour
10 fonctionnaliser un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique.

Le problème de l'entrée dans les cellules vivantes de différentes substances dotées de propriétés pharmacologiques revêt une grande importance sur le plan thérapeutique. Les peptides synthétiques et les oligonucléotides traversent
~~difficilement la membrane cellulaire. Une approche intéressante pour améliorer leur~~
15 capacité à pénétrer dans la cellule est de les modifier par une partie lipophile. Ainsi, il a été montré qu'un peptide modifié par une simple chaîne aliphatique est capable de pénétrer au sein de la cellule par transfert passif au travers de la membrane et d'interagir avec sa cible intracytoplasmique. Les lipopeptides représentent donc des molécules intéressantes pour vectoriser un motif fonctionnel au sein de la cellule.

La synthèse de lipopeptides peut être réalisée, par exemple, en
20 couplant un acide gras à un peptide en phase solide. En fin de synthèse, des étapes de clivage de la liaison peptide/support solide et de déprotection des chaînes latérales du peptide par un acide fort doivent être réalisées. Ce traitement limite de façon importante le choix de la partie lipophile ; il interdit notamment l'utilisation d'acides
25 gras insaturés. En outre, la purification des lipopeptides par chromatographie liquide haute performance en phase inverse est difficile et conduit à des rendements faibles, eu égard aux nombreuses impuretés qui sont présentes en fin de synthèse.

Il a également été proposé de coupler, en phase homogène, une protéine à un groupement palmitoyl-coenzyme A, ce dernier étant introduit au niveau
30 du groupement thiol d'une cystéine. Un tel couplage se traduit par la formation d'un lien thioester, qui présente l'inconvénient d'être peu stable. D'autre part, cette stratégie est limitée à la modification de certaines protéines par le palmitoyl-coenzyme A et ne peut pas être généralisée à la synthèse de lipopeptides.

Les stratégies actuelles pour la synthèse de lipopeptides consistent
35 également à mettre en oeuvre des réactions de ligation chimique. La ligation chimique permet de lier, en phase homogène et dans des conditions extrêmement douces, deux

structures peptidiques préalablement purifiées et totalement déprotégées.

Il a ainsi été proposé de lier, dans un tampon aqueux, un acide gras à un peptide par un lien disulfure. Cependant, le lien disulfure pose de nombreux problèmes ; un tel lien est en effet peu stable et susceptible d'être dégradé en présence

5 de thiols, d'où la nécessité d'éviter la contamination des solvants utilisés pour la solubilisation des produits par des thiols, ainsi que l'impossibilité d'introduire une cystéine dans la séquence peptidique à vectoriser. L'utilisation de la chimie des thiols nécessite, en outre, de travailler sous atmosphère inerte dans le but d'éviter l'oxydation des thiols.

10 W. ZENG *et al.* (*J. Pept. Sc.*, 1996, 2, 66-72) ont également proposé de lier, en phase homogène, un peptide totalement déprotégé et préalablement purifié à une structure lipidique polyfonctionnelle liée à un peptide, et ce par le biais d'un lien oxime. La partie lipophile est introduite sur une séquence peptidique en phase solide, ~~une telle méthode présentant les inconvénients mentionnés ci-dessus, à savoir la~~
15 limitation au niveau du choix de la partie lipophile et les difficultés liées à la purification de la structure lipidique.

De façon similaire, O. MELNYK *et al.* (*J. Peptide Res.*, 1998, 52, 180-184) ont décrit la ligation, en phase homogène et par un lien hydrazone, entre un aldéhyde lipophile de nature peptidique et un autre peptide modifié au niveau de la
20 chaîne latérale de lysine par un groupement hydrazino. Le lien hydrazone est réalisé en phase homogène, mais l'aldéhyde lipophile est synthétisé en phase solide et les limitations sont identiques à celles évoquées précédemment. De plus, le lien hydrazone est sensible aux conditions acides.

La ligation chimique apparaît comme une méthode de choix pour la
25 synthèse de lipopeptides permettant l'amélioration des rendements d'obtention de ces composés. Cependant, nous avons vu qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthodes de ligation n'utilisant pas la chimie des thiols et permettant un couplage direct d'un composé lipophile, non lié à une structure porteuse, à un peptide totalement déprotégé.

30 Les Inventeurs se sont donc donnés pour but de pourvoir à une nouvelle stratégie de synthèse de lipopeptides et, de façon générale, de peptides modifiés par différents composés de nature lipidique ou autre, par ligation chimique en milieu homogène.

Cette nouvelle stratégie de synthèse doit notamment répondre aux
35 critères suivants :

- le couplage du composé sus-mentionné, par exemple un lipide, au

peptide s'effectue en phase homogène,

- le couplage s'effectue à partir d'un peptide totalement déprotégé, la réaction étant chimiosélective,

- les conditions réactionnelles du couplage permettent l'utilisation directe d'acides gras et de dérivés du cholestérol commerciaux,
- les conditions réactionnelles du couplage permettent notamment l'introduction, sur le peptide, d'acides carboxyliques et d'alcools sensibles, comme par exemple des acides gras complexes mono- et polyinsaturés et des dérivés du cholestérol,
- le lien formé au cours du couplage est très stable dans une large gamme de pH.

Les Inventeurs se sont également donnés pour but de pourvoir à des peptides modifiés, susceptibles d'être obtenus par ligation chimique, dans lesquels ~~lesdits peptides sont liés à différents composés, notamment à des lipides, par un lien~~ très stable et qui ne présentent pas les inconvénients des liens disulfures de l'Art antérieur.

Ces buts sont atteints par la création d'un lien hydrazide entre le peptide et le composé qui lui est couplé, lors d'une synthèse convergente en phase homogène.

La présente invention a pour objet un procédé de couplage entre un peptide et au moins un composé A, de nature non peptidique, portant une fonction sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions acide carboxylique et les fonctions alcool, caractérisé en ce que ledit couplage comprend au moins une étape de réalisation, en phase homogène, d'un lien hydrazide entre ledit peptide et ledit composé A.

Au sens de la présente invention, on entend par " peptide " tout enchaînement de plusieurs acides aminés, quels que soient leur nature et leur nombre ; le terme " peptide " désigne donc aussi bien des oligopeptides (dipeptides ou tripeptides) que des polypeptides ou des protéines. On entend également par " lien hydrazide " une liaison covalente comprenant le motif -CO-NH-NH-.

De façon particulièrement avantageuse, le procédé selon l'invention, réalisé en phase homogène, permet d'éviter une étape de clivage du peptide modifié obtenu du support, clivage dont nous avons vu précédemment qu'il limite de façon importante le choix du composé couplé audit peptide. En outre, le lien hydrazide réalisé entre le peptide et le (ou les) composé(s) A est très stable, et ce dans une gamme de pH très large, et *in vivo*.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon la présente invention, ce dernier comprend, pour réaliser ledit lien hydrazide, les étapes suivantes :

- a) activation de la fonction portée par ledit composé A en une
 - 5 fonction réactive correspondante, respectivement sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions ester et les fonctions carbonate, lorsque le composé A porte respectivement une fonction acide carboxylique et une fonction alcool ; et
 - b) réaction, en phase homogène et à un pH inférieur à 6, entre ledit composé A activé obtenu en a) et un peptide, totalement déprotégé, portant un
 - 10 groupement hydrazine ou dérivé d'hydrazine soit au niveau de son extrémité N-terminale, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.

Au sens de la présente invention, on entend par "groupement hydrazine" ou "groupement dérivé d'hydrazine" tout groupement comprenant le

- 15 motif -NH-NH₂.

Un groupement hydrazine peut être introduit, soit au niveau de l'extrémité N-terminale du peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique, par tout moyen connu de l'Homme de l'Art, par exemple selon

- 20 un protocole de N-amination tel que décrit par C. KLINGUER *et al.* dans Tetrahedron Letters, 1996, 37, 40, 7259-7262.

De façon particulièrement avantageuse, la réaction entre ledit composé A activé et ledit peptide totalement déprotégé, fonctionnalisé tel que décrit ci-dessus, permet d'éviter toute étape de déprotection des chaînes latérales du peptide

- 25 avec un acide fort, étape dont nous avons vu précédemment qu'elle limite de façon importante le choix du composé couplé audit peptide. Ainsi, la réaction entre ledit composé A activé et ledit peptide totalement déprotégé, fonctionnalisé tel que décrit ci-dessus, permet d'obtenir directement le peptide modifié, c'est-à-dire le peptide couplé au composé A.

Le procédé selon l'invention permet de réaliser une réaction chimiosélective entre le groupement fonctionnel (groupement hydrazine ou dérivé d'hydrazine) introduit sur le peptide et le (ou les) composé(s) A activés ; en effet, la réaction s'effectue à un pH inférieur à 6, pH tel que les fonctions amines des chaînes latérales des lysines (fonction ϵ -NH₂) ou des ornithines (fonction δ -NH₂) ou la

- 35 fonction α -NH₂ N-terminale éventuellement présentes au sein de la séquence peptidique sont protonnées et donc peu réactives. Le contrôle du pH permet donc

d'acyler préférentiellement le groupement hydrazine ou dérivé d'hydrazine introduit sur le peptide, sans que les autres groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés constitutifs du peptide réagissent.

La réaction de couplage réalisée au cours du procédé selon la

5 présente invention (étape b) s'effectue dans des conditions opératoires très douces et, de façon particulièrement avantageuse, ne nécessite pas de travailler dans des conditions inertes, comme c'est le cas pour certains des procédés de l'Art antérieur, notamment ceux qui consistent à coupler un peptide à un acide gras par un lien disulfure.

10 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon l'invention, ledit procédé comprend, en outre, une étape c) de purification du peptide modifié obtenu à l'étape b).

Une telle purification est, de façon classique, réalisée par chromatographie liquide haute performance. En comparaison à la purification d'un
15 peptide modifié obtenu par un procédé de couplage réalisé en phase solide, tel que décrit précédemment, la purification du peptide modifié obtenu par le procédé de couplage conforme à la présente invention conduit à des rendements bien meilleurs, le peptide modifié obtenu à l'étape b) étant plus pur qu'un peptide modifié obtenu en phase solide.

20 Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon l'invention, après l'étape a) d'activation de la fonction portée par le composé A, la fonction réactive correspondante portée par le composé A est sélectionnée dans le groupe constitué par les esters et les carbonates de succinimidyle, de sulfosuccinimidyle et d'aryle.

25 A titre d'exemple d'esters et de carbonates d'aryle, on peut citer les esters et les carbonates de para-nitrophényle.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon l'invention, ledit groupement dérivé d'hydrazine portée par le peptide est un groupement α -hydrazinoacétique.

30 Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, préalablement à l'étape b) du procédé selon l'invention, ledit peptide est fonctionnalisé par un groupement α -hydrazinoacétique, soit au niveau de son extrémité N-terminale, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence
35 peptidique, à l'aide de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique ou de l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique.

Selon une modalité préférée de cette disposition, la fonctionnalisation dudit peptide par un groupement α -hydrazinoacétique, grâce à l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique ou à l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique, est suivie d'une étape de purification dudit peptide fonctionnalisé par chromatographie

- 5 liquide haute performance, à l'aide d'un éluant constitué d'un mélange eau/alcool, de préférence un mélange eau/isopropanol, comprenant de l'acide trifluoroacétique. Un tel éluant permet avantageusement d'éviter toute dégradation du groupement α -hydrazinoacétique porté par le peptide.

- Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de
10 couplage selon l'invention, ledit composé A est sélectionné dans le groupe constitué par les lipides, les sucres, les alcools et les marqueurs de fluorescence.

A titre d'exemple de marqueur de fluorescence utilisable, on peut citer, de façon non limitative, la fluorescéine ou la rhodamine.

~~Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, lesdits~~

- 15 lipides sont sélectionnés dans le groupe constitué par les acides gras saturés, les acides gras insaturés et les stérols. En effet, le procédé selon l'invention permet avantageusement de coupler à un peptide des acides gras complexes (mono- et polyinsaturés) et, de manière générale, tout acide carboxylique sensible. De préférence, les lipides sus-mentionnés sont sélectionnés dans le groupe constitué par
20 l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide cis-9,10-époxytéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et le cholestérol.

- La présente invention a également pour objet un peptide modifié essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un composé A portant, avant sa liaison audit peptide, une fonction sélectionnée dans le
25 groupe constitué par les fonctions acide carboxylique et les fonctions alcool.

Selon un mode de réalisation avantageux, le peptide modifié selon la présente invention est essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un composé sélectionné dans le groupe constitué par les lipides, les sucres, les alcools et les marqueurs de fluorescence.

- 30 Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, le peptide modifié selon la présente invention est un oligopeptide essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un lipide sélectionné dans le groupe constitué par les acides gras saturés, les acides gras insaturés et les stérols.

- De préférence, ledit oligopeptide selon l'invention est
35 essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un lipide sélectionné dans le groupe constitué par l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide

cis-9,10-époxystéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et le cholestérol.

La stabilité du lien hydrazide rend les peptides modifiés selon l'invention particulièrement intéressants, puisque le lien hydrazide est stable aussi bien *in vivo* que dans une gamme de pH très large. En outre, le lien hydrazide est

5 stable dans des conditions d'hydrogénation catalytique, ce qui permet, par exemple dans le cas de peptides modifiés par des acides gras insaturés, la synthèse de lipopeptides marqués au tritium au niveau de la chaîne grasse, utiles pour un suivi radioactif intracellulaire desdits lipopeptides et une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action.

10 La présente invention a également pour objet un vaccin synthétique et un réactif de diagnostic qui comprennent au moins un peptide modifié selon la présente invention, tel que décrit ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation du procédé de couplage conforme à l'invention, tel que décrit ci-dessus, pour la préparation d'un
15 médicament comprenant un principe actif de nature peptidique vectorisé, utile pour le ciblage cellulaire.

La présente invention a, en outre, pour objet l'utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique ou de l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique pour fonctionnaliser un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique, soit au niveau de
20 l'extrémité N-terminale dudit peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.

Il est bien entendu, toutefois, qu'un groupement α -hydrazinoacétique peut être introduit sur ledit peptide, soit au niveau de l'extrémité
25 N-terminale dudit peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique, par tout procédé connu de l'Homme de l'Art ; par exemple, la fonctionnalisation d'un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique peut être réalisée par une réaction de N-amination en phase solide, telle que décrite par
30 C. KLINGUER *et al.* dans Tetrahedron Letters, 1996, 37, 40, 7259-7262, au moyen du réactif commercial N-Boc-3-(4-cyanophényl)oxaziridine (BCPO). C'est le cas, par exemple, d'une réaction de N-amination effectuée au niveau d'un résidu glycine situé en position N-terminale d'un peptide ou au niveau de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.

35 Toutefois, étant donné le coût élevé du BCPO et le temps très important requis pour une telle réaction, cette voie de synthèse n'est adaptée qu'à la

fonctionnalisation de produits à haute valeur ajoutée, synthétisés en faible quantité. De façon particulièrement avantageuse, l'utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)-hydrazinoacétique ou de l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique selon la présente invention est plus simple et bien moins coûteuse pour fonctionnaliser un peptide par

5 un groupement α -hydrazinoacétique. Cette fonctionnalisation est effectuée en phase solide, le peptide fonctionnalisé étant ensuite séparé du support solide et déprotégé selon des méthodes connues de l'Homme de l'Art; une étape de purification par chromatographie liquide haute performance peut ensuite être effectuée, en utilisant l'éluant eau/alcool tel que décrit précédemment, qui permet avantageusement d'éviter

10 toute dégradation du groupement α -hydrazinoacétique porté par le peptide.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention et de synthèses

~~de peptides modifiés selon la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans~~

15 lesquels :

- la figure 1 illustre la synthèse des acides N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4 et N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique 4';
- la figure 2 illustre la synthèse d'un hydrazinopeptide 6 à partir d'un peptide 5 et de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique ;
- 20 - la figure 3 illustre la synthèse des lipopeptides 11, 12, 13, 14, 16 et 18 selon le procédé conforme à la présente invention, à partir de l'hydrazinopeptide 6 et des lipides 7, 8, 9, 10, 15 et 17, Su représentant un groupe succinimidyle ;
- la figure 4 illustre la synthèse du lipopeptide 13 par hydrogénation catalytique du lipopeptide 12 ;
- 25 - la figure 5 illustre la synthèse du lipopeptide 21 selon le procédé conforme à la présente invention ;
- la figure 6 illustre la synthèse des lipopeptides 23 et 24 selon le procédé conforme à la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés

30 uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Dans les exemples qui suivent, les abréviations suivantes sont utilisées : eq. : équivalents ; Boc : *tert*-butyloxycarbonyl ; Boc₂O : éther de di(*tert*-butyloxycarbonyl) ; CH₂Cl₂ : dichlorométhane ; AcOH : acide acétique ; AcOEt :

35 acétate d'éthyle ; Na₂SO₄ : sulfate de sodium ; KH₂PO₄ : dihydrogénophosphate de potassium ; Na₂HPO₄ : phosphate de disodium ; DMF : diméthylformamide ; DMAP :

4-diméthyl-aminopyridine ; PEG : polyéthylèneglycol ; PS : polystyrène ; CDCl_3 : chloroforme deutéré ; $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{H}$: acide acétique d_3 ; TFA : acide trifluoroacétique ; Et_2O : diéthyléther ; THF : tétrahydrofurane ; HBTU : N-oxyde d'hexafluorophosphate de N-[(1H-benzotriazol-1-yl) (diméthylamino) méthylène]-N-

5 méthylméthanaminium ; HOBT : N-hydroxy-benzotriazole ; $t\text{Bu}$: *tert*-butyl ; DIEA : diisopropyléthylamine ; Pmc : 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulphonyle ; Trt : trityle ; Fmoc : 9-fluorénylméthoxy-carbonyl ; Pbf : 2,2,4,6,7- pentaméthylidihydro-benzofurane-5-sulphonyl ; BOP : benzotriazole-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphoniumhexafluorophosphate ; HPLC : chromatographie liquide haute
10 performance ; RP-HPLC : chromatographie liquide haute performance en phase inverse ; ES-MS : spectrométrie de masse par électronébulisation ; TOF : time-of-flight ; MALDI : matrix-assisted laser desorption ionisation ; RMN : résonance magnétique nucléaire ; TOCSY : total correlation spectroscopy ; PDMS :
Spectrométrie de Masse à Désorption de Plasma ; PAL : peptide-amide linker.

15 **EXEMPLE 1 : Synthèse des acides N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4 et N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique 4' (figure 1).**

1) Synthèse de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4

• Synthèse du N-Boc hydrazinoacétate d'éthyle 2

1.99 g (12.8 mmoles) d'hydrazinoacétate d'éthyle commercial 1 et
20 3.14 g (14.4 mmoles) de Boc_2O sont dissous dans 13 ml d'un mélange eau/éthanol (1/1). Après dissolution des réactifs, 1.58 ml de N-méthylmorpholine (14.4 mmoles) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 2h d'agitation à température ambiante, le mélange est dilué dans 50 ml d'eau. La phase aqueuse est saturée avec du KH_2PO_4 , puis extraite avec de l'éther de pétrole (2 x 30 ml) et du diéthyléther (3 x 30 ml). Les
25 phases organiques sont réunies puis séchées sur sulfate de sodium et enfin concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu 2 est une huile jaune (2.66 mg, 12 mmoles, rendement : 93,7%), utilisée sans autre forme de purification dans la suite de la synthèse. L'analyse du produit 2 par RMN est la suivante : RMN ^1H (CDCl_3 , réf TMS, 323 K) δ : 4.19 (q, 2H, $J=7$ Hz), 4.11 (s, 2H), 1.45 (m, 9H), 1.26 (t, 3H, $J=7.16$
30 Hz).

• Synthèse du N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétate d'éthyle 3

Le composé 2 (3.26 g, 14.9 mmoles) est dissous dans 3 ml de CH_2Cl_2 en présence de 4.36 ml de Et_3N (31.29 mmoles) à 0°C . Par ailleurs, 6.83 g (31.29 mmoles) de Boc_2O sont dissous dans 5ml de CH_2Cl_2 en présence de 546 mg
35 (4.47 mmoles) de DMAP à 0°C . Après dissolution totale des réactifs, le mélange composé 2 / Et_3N est additionné gouttes à gouttes au mélange Boc_2O / DMAP. Une

fois l'addition terminée, la température du milieu réactionnel est progressivement ramenée à température ambiante. Après 2h d'agitation, le milieu est dilué avec 10 ml de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec une solution saturée en KH_2PO_4 , séchée sur sulfate de sodium puis distillée sous pression réduite. L'huile jaune-orangé

- 5 résiduelle est purifiée par chromatographie sur silice (40-60 microns) avec un mélange CH_2Cl_2 / AcOEt (97 : 3). Le produit obtenu 3 est une huile jaune (3.0 g, 7.2 mmoles, rendement : 48%). Son analyse RMN est la suivante : RMN ^1H (DMF_{d7} , réf TMS, 330 K) δ : 4.18 (s, 2H), 4.16 (q, 2H, $J=7$ Hz), 1.46 (m, 27H), 1.22 (t, 3H, $J=7$ Hz).

L'analyse du produit 3 par spectrométrie de masse est la suivante :

- 10 MALDI-TOF $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 419.5, trouvé : 441.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 457.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

• *Synthèse de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4*

Le composé 3 (3.0 g, 7.2 mmoles) est traité, à température ambiante, par un mélange constitué de 10,8 ml de soude 1 M et de 10 ml d'éthanol. Le mélange est agité 2h30 à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec

- 15 20 ml d'eau, extrait en milieu basique avec 2 x 20 ml d'éther, puis acidifié par ajout d'acide chlorhydrique 1 N. La phase aqueuse est alors extraite avec du dichlorométhane (2 x 20 ml) puis du diéthyl éther (2 x 20 ml). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées sous pression réduite. Le mélange résiduel est recristallisé dans un mélange diéthyl éther/heptane (2/3). Le
- 20 produit obtenu 4 est un solide blanc (1.7 g, 4.4 mmoles, rendement : 61%). Son analyse RMN est la suivante : RMN ^1H (DMF_{d7} , réf TMS, 330 K) δ : 4.20 (s, 2H), 1.47 (brs, 27H) ; RMN ^{13}C (DMF_{d7}) 169.7 (C=O), 150.9 (C=O), 85.7 (C quaternaire), 51.8 (CH_2), 27.9 (CH_3).

2) *Synthèse de l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique 4'*

- 25 • *Synthèse du N-Boc hydrazinoacétate d'éthyle 2*

- 14,9 g (96.4 mmoles) d'hydrazinoacétate d'éthyle commercial 1 et 26.1 g (119.5 mmoles) de Boc_2O sont dissous dans 70 ml d'un mélange eau/éthanol (1/1). Après dissolution des réactifs, le milieu réactionnel est refroidi à 0°C. 13.2 ml de N-méthylmorpholine (119.5 mmoles) sont ajoutés goutte-à-goutte. Après 15
- 30 minutes d'agitation à 0°C, puis 2h à température ambiante, le mélange est dilué dans 100 ml d'eau. La phase aqueuse est saturée avec du KH_2PO_4 , puis extraite avec du diéthyléther (2 x 70 ml) et de l'éther de pétrole (2 x 70 ml). Les phases organiques sont réunies puis séchées sur sulfate de sodium anhydre et enfin concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu 2 est une huile jaune (19.8 g, 91.1 mmoles,
- 35 rendement : 94,5%). Elle est séchée sur du pentaoxyde de phosphore (P_2O_5) pendant une nuit. Le produit 2 ainsi obtenu est utilisé sans autre forme de purification dans la

suite de la synthèse. L'analyse du produit **2** par RMN est la suivante : RMN ^1H (CDCl_3 , réf TMS, 323 K) δ : 4.19 (q, 2H, $J=7.18$ Hz), 4.11 (s, 2H), 1.45 (m, 9H), 1.26 (t, 3H, $J=7.16$ Hz). RMN ^{13}C (CDCl_3 , réf TMS, 323 K) δ : 175.51 et 174.38 (C=O), 161.76 et 160.83 (C=O), 85.89 et 85.23 (C quaternaire), 65.57 et 65.46 (OCH_2CH_3),

5 57.41 (CH_2CO), 32.87, 32.78 et 32.63 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 18.70 (CH_2CH_3).

Analyse élémentaire du produit **2** (formule brute : $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$) : C 49.53, H 8.31, N 12.84, O 29.32 (calculée), C 49.78, H 8.36, N 12.33, O 29.27 (trouvée).

• *Synthèse du N,N' -tri(Boc)hydrazinoacétate d'éthyle **3***

10 Le composé **2** (19.86 g, 91.1 mmol) est dissous dans 16 ml de CH_2Cl_2 sous atmosphère inerte et en présence de 38.5 ml de Et_3N (276 mmol) à 0°C . Par ailleurs, 60.2 g (276 mmol) de Boc_2O sont dissous dans 20 ml de CH_2Cl_2 en présence de 3.4 g (27.6 mmol) de DMAP à 0°C . Après dissolution totale des réactifs, le mélange composé **2** / Et_3N est additionné gouttes à gouttes au mélange

15 Boc_2O / DMAP sous atmosphère inerte et à 0°C . Une fois l'addition terminée, la température du milieu réactionnel est progressivement ramenée à température ambiante. Après 2h d'agitation, le milieu est dilué avec 50 ml de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec une solution saturée en KH_2PO_4 (3 x 75 ml), séchée sur sulfate de sodium puis concentrée sous pression réduite. L'huile jaune-orangé
20 résiduelle est purifiée par filtration sur silice (40-60 microns, 160 g) avec un mélange CH_2Cl_2 / AcOEt (97 : 3). L'huile jaune résiduelle est séchée une nuit en présence de P_2O_5 . 36.9 g (88.3 mmol ; rendement : 96.9%) de produit **3** sont ainsi obtenus.

L'analyse du produit **3** par RMN est la suivante : RMN ^1H (CDCl_3 , réf TMS, 300 K) δ : 4.16 (s, 2H), 3.71 (q, 2H, $J=7$ Hz), 1.46 (m, 27H), 1.23 (t, 3H, $J=7$ Hz). RMN ^{13}C (CDCl_3 , réf TMS, 300 K) δ : 167.74 (C=O), 150.48 et 150.23 (C=O), 83.68, 82.46 et 82.00 (C quaternaire), 60.98 et 58.40 (OCH_2CH_3), 53.51 et 51.57 (CH_2CO), 28.09 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 18.42 et 14.20 (CH_2CH_3).

Analyse élémentaire du produit **3** (formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$) : C 54.53, H 8.19, N 6.69 (calculée), C 54.81, H 8.25, N 6.71 (trouvée).

30 L'analyse du produit **3** par spectrométrie de masse est la suivante : MALDI-TOF $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 419.5, trouvé : 441.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 457.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

• *Synthèse de l'acide N,N' -di(Boc)hydrazinoacétique **4'***

35 Le composé **3** (36.9 g, 88.3 mmol) dissous dans 135 ml d'éthanol est traité par 135 ml de soude molaire à 0°C . Après 30 minutes d'agitation à 0°C , la température du milieu réactionnel est progressivement ramenée à température ambiante. Le mélange est alors agité 3h30 à température ambiante. Le milieu

réactionnel est ensuite dilué avec 110 ml d'eau et extrait avec du diéthyl éther (2 x 80 ml). La phase aqueuse est acidifiée par ajout d'acide chlorhydrique 1 N jusqu'à un pH de 2. La réaction est exothermique. La phase aqueuse est alors extraite avec du dichlorométhane (2 x 80 ml) puis du diéthyl éther (2 x 80 ml). Les phases organiques

- 5 sont réunies, lavées avec une solution saturée de KH_2PO_4 , séchées sur Na_2SO_4 anhydre, filtrées et enfin concentrées sous pression réduite. Le mélange résiduel est conservé pendant une nuit à 4°C puis il est recristallisé dans un mélange diéthyl éther/heptane (90 ml/120 ml) à froid. Le produit obtenu 4' est un solide blanc (17.9 g, 61.6 mmol, rendement : 69.8%). Son analyse RMN est la suivante : RMN ^1H (DMF- d_7 , réf TMS, 330 K) δ : 4.20 (s, 2H), 1.47 (brs, 27H) ; RMN ^{13}C (DMF- d_7) 169.7 (C=O), 150.9 (C=O), 85.7 (C quaternaire), 51.8 (CH_2), 27.9 (CH_3).
- 10

EXEMPLE 2 : Synthèse et purification de l'hydrazinopeptide 6 (figure 2).

• Synthèse de l'hydrazinopeptide 6

- Le peptide 5 est élaboré sur une résine Wang (0.73 mmol/g, Applied Biosystems, Foster City, USA), selon la stratégie Fmoc/*tert*-butyl, telle que décrite par exemple par FIELDS *et al.* dans *Int. J. Pept. Protein*, 1990, 35, 161, et une activation HBTU/HOBt (voir SCHNÖLZER *et al* dans *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, 40, 180), à l'aide d'un synthétiseur de peptides Applied Biosystem 431A (Foster City, USA). Les protections des chaînes latérales sont : His(Trt), Glu(O^tBu), Arg(Pmc), Lys(Boc).
- 20 En fin de synthèse, le groupement Fmoc de la fonction $\alpha\text{-NH}_2$ de l'arginine est déplacé en présence de pipéridine 20% dans le DMF. L'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4 (1.2 eq) est ensuite introduit manuellement en utilisant l'activation BOP *in situ* (BOP 1.2 eq, DIEA 3.6 eq dans le DMF durant 20 min), comme décrit par exemple par GAIRI *et al.* dans *Tetrahedron Letters*, 1990, 50, 7363.
- 25 On pourrait également, en variante, utiliser l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique. La peptidyl-résine est lavée successivement avec du DMF, du dichlorométhane, puis de l'éther. Elle est ensuite séchée sous pression réduite durant 30 min.

- La coupure du lien peptide-résine ainsi que la déprotection des chaînes latérales sont réalisées en présence d'un mélange TFA/ H_2O /anisole (1 g de résine sèche/9.5 ml de TFA/0.25 ml d'anisole/0.25 ml d' H_2O) sous agitation durant 2h à température ambiante. Le peptide 6 est précipité dans un mélange Et_2O /heptane (1/1) préalablement refroidi à 0° C (200 ml). Le précipité est centrifugé puis dissous dans un mélange H_2O /AcOH (5/1), congelé et lyophilisé.
- 30

• Purification de l'hydrazinopeptide 6

- 35 L'hydrazinopeptide 6 a été purifié par HPLC sur une colonne C18 hyperprep en utilisant un gradient linéaire de 0% à 50% d'un mélange

TFA/eau/isopropanol (rapport eau/isopropanol de 2/3, le mélange comprenant 0,05% de TFA) dans un mélange 0.05% TFA/eau. Un tel éluant permet avantageusement d'éviter toute dégradation du peptide. Le composé purifié est lyophilisé et stocké à -20°C.

5 La pureté du composé purifié est contrôlé par HPLC analytique sur une colonne C18 Vydac en utilisant le même système éluant que précédemment. L'identité du peptide 6 a été vérifiée par analyse ES-MS sur un spectromètre Micromass Quatro ($[M+H]^+$ calculé 1432.5, trouvé 1432.7).

• Caractérisation de la peptidyl-résine 5

10 Avant introduction de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4, la composition en acide aminé du peptide 5 a été vérifiée par une hydrolyse totale réalisée sur la peptidyl-résine en présence d'un mélange acide chlorhydrique 6N/acide propionique (1/1) et de quelques gouttes de phénol à 140°C durant 3h. Cette hydrolyse est suivie de l'identification sur un analyseur d'acides aminés Beckman, modèle 7300.

15 **EXEMPLE 3 : Synthèse des lipopeptides 11, 12, 13, 14, 16 et 18 (figure 3).**

1) Synthèse des composés 7, 8, 9, 10, 15 et 17

• Synthèse des composés 7, 8, 9, 15 et 17.

20 Dans le cas où R (figure 3) représente la chaîne grasse d'un acide oléique, 10 mg (35.4 μ moles) d'acide oléique, 4.08 mg (35.4 μ moles) de N-hydroxysuccinimide et 4.3 μ l (27.2 μ moles) de diisopropylcarbodiimide sont dissous dans un mélange THF/dichlorométhane (175 μ l / 175 μ l). Après une nuit à 0°C, le milieu est concentré sous pression réduite. L'huile résiduelle (composé 8) est reprise dans 6.8 ml de 2-méthyl-propane-2-ol.

25 On procède de la même manière pour activer les acides palmitique, stéarique, linoléique et cis-9,10-époxy-stéarique, c'est-à-dire pour obtenir ces acides sous forme d'esters de succinimidyle (obtention des composés 7, 9, 17 et 15).

• Synthèse du composé 10.

30 500 mg (1.13 mmoles) de chloroformiate de cholestéryle et 140.9 mg (1.22 mmoles) de N-hydroxysuccinimide sont dissous dans 2 ml de dichlorométhane à température ambiante. 170 μ L (1.22 mmoles) de triéthylamine sont ajoutés au milieu réactionnel. La réaction est exothermique et il se forme un précipité blanchâtre. Après 45 min d'agitation à température ambiante, le milieu est dilué avec 50 ml de dichlorométhane et lavé avec une solution de KH_2PO_4 saturée. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis concentrée sous pression
35 réduite. Le composé 10 obtenu est un solide blanc (451.6 mg, 0.85 mmoles, rendement : 76%). Il s'agit d'un carbonate de cholestéryle activé par le

N-hydroxysuccinimide.

2) Synthèse du lipopeptide 11

• Protocole.

- 6 mg (3 μ moles) de l'hydrazinopeptide 6, dont la synthèse a été
- 5 décrite dans l'exemple 2, sont dissous dans 900 μ l d'un tampon phosphate/citrate 0.25 mM, pH=5.2 (160.2 μ l d'une solution de Na_2HPO_4 0.2 M et 139.8 μ l d'acide citrique 0.1 M complété à 1.2 ml avec de l'eau). Le pH de l'hydrazinopeptide 6 en solution est réajusté si nécessaire avec la solution de Na_2HPO_4 0.2 M. 1.48 mg (3.6 μ moles) de palmitoate de succinimidyle 7 sont dissous dans 900 μ l de 2-méthylpropane-2-ol. Les deux solutions sont ensuite mélangées et agitées à température
- 10 ambiante durant 72 h.

L'utilisation d'un milieu mixte tampon/2-méthylpropane-2-ol permet à la fois de contrôler le pH du milieu réactionnel et d'assurer la bonne solubilité de l'hydrazinopeptide 6, de l'acide gras 7 et du lipopeptide final 11. De plus,

- 15 l'introduction de la partie lipophile sur le peptide se fait dans des conditions douces, autorisant ainsi l'introduction d'acides gras sensibles aux acides forts.

- L'avancement de la réaction est suivi par HPLC sur une colonne C3 Zorbax (0 à 100% de solvant B à 0.05% TFA/80% acétonitrile/20% eau en 30 mn puis 5 min à 100% de solvant B, 1 ml/mn, détection à 215 nm). Après 72 h, le suivi par
- 20 HPLC révèle que la réaction est terminée. Le milieu réactionnel est alors dilué avec 5 ml d'un mélange eau/acide acétique (80/20) et purifié sur une colonne C3 Zorbax en utilisant le système éluant précédent. Après congélation et lyophilisation, le lipopeptide 11 est obtenu avec un rendement de 61% (3.89 mg, 1.83 μ moles). On obtient seulement 6% de lipopeptide diacylé (couplage du groupement palmityle non
- 25 seulement sur le groupement hydrazine du peptide 6, mais aussi sur la fonction amine située sur la chaîne latérale du résidu lysine dudit peptide).

• Caractérisation du lipopeptide 11.

Le composé purifié est analysé par ES-MS (Micromass Quatro II Electrospray Mass Spectrometer). $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 1672.1, trouvé : 1671.6.

- 30 L'analyse RMN TOCSY confirme la structure du produit 11. L'échantillon est préparé en dissolvant le lipopeptide 11 dans 500 μ l d'un mélange $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{H}$ / H_2O (80/20). La concentration finale du peptide 11 est de 5 mM. Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au sel de sodium de l'acide 3-(triméthylsilyl)[2,2,3,3- d_4] propionique, utilisé comme référence interne.
- 35 L'acquisition du spectre RMN est réalisée sur un Bruker DRX 300 à 300 K.

3) Synthèse des lipopeptides 12, 13, 14, 16 et 18

On procède de façon similaire à ce qui a été décrit en 2) pour la synthèse du lipopeptide 11, en faisant réagir l'hydrazinopeptide 6 avec, respectivement, les composés 8, 9, 10, 15 et 17.

5 Seule la purification du lipopeptide 16 varie. Sa purification par HPLC est réalisée à pH 7.0 sur une colonne C3 Zorbax en utilisant l'éluant suivant : de 100% de solvant A (tampon phosphate 50 mM, pH 7.0) à 100% de solvant B (tampon phosphate 50 mM, pH 7.0, comprenant 50% d'isopropanol) en 100 minutes, à raison de 3 ml/minute et à 50°C, la détection s'effectuant à 215 nm. Le composé 16
10 ainsi obtenu est ensuite dessalé en utilisant les conditions suivantes : colonne polystyrène-divinylbenzène, gradient de 100% de solvant A (eau comprenant 0,05% de triéthylamine) à 100% de solvant B (mélange eau/acétonitrile 20/80 comprenant 0,05% de triéthylamine) en 10 minutes, à raison de 4 ml/minute et à 50°C, la détection s'effectuant à 215 nm.

15 La caractérisation des lipopeptides 12, 13, 14, 16 et 18 par ES-MS et les rendements obtenus pour les différents lipopeptides sont les suivants (tableau I) :

Tableau I

lipopeptide	groupe lipophile	[M+H] ⁺ calculé	[M+H] ⁺ trouvé	rendement
<u>12</u>	oléyle	1697.2	1697.8	53%
<u>13</u>	stéaryle	1699.2	1699.5	65%
<u>14</u>	cholestéryle	1845.6	1845.7	56%
<u>16</u>	cis-9,10-époxy-stéaryle	1713.2	1713.5	53%
<u>18</u>	linoléyle	1695.2	1695.5	51%

20 On obtient seulement 6, 7 et 8% respectivement de lipopeptides diacylés lors des synthèses des lipopeptides 12, 13 et 14.

EXEMPLE 4 : Synthèse du lipopeptide 13 par hydrogénation catalytique du lipopeptide 12 (figure 4).

500 µg de palladium sur charbon à 10% en suspension dans 600 µl
25 d'une solution à 20% d'acide acétique concentré dans l'eau sont ajoutés à 5 mg (2.3 µmoles) du composé 12, obtenu de la façon décrite dans l'exemple précédent, dissous dans 300 µl de la même solution. Après 4 h d'agitation à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène, 1.64 mg de palladium sur charbon en suspension dans 100 µl d'acide acétique glacial sont ajoutés au milieu réactionnel.
30 Après 20 h, la conversion est totale et le milieu est filtré sur celite et lavé avec une

solution à 20% d'acide acétique dans l'eau (3 x 3 ml), puis du méthanol (3 x 3 ml). Le filtrat est concentré sous pression réduite, congelé puis lyophilisé. Le composé ainsi obtenu est purifié par HPLC sur une colonne C3 Zorbax en utilisant un gradient linéaire de 0% à 55% d'un mélange eau/acétonitrile/TFA (1/4 en eau/acétonitrile, avec

5 0,05% de TFA) dans un mélange 0.05% TFA/eau (eau comprenant 0,05% de TFA). Le composé purifié (2.55 mg, 1.2 mmoles, rendement : 52%) est lyophilisé et stocké à -20%.

La pureté du composé purifié est contrôlée par HPLC analytique sur une colonne C3 Zorbax en utilisant le même système éluant que précédemment. Le
10 composé est identifié par ES-MS : $[M+H]^+$ calculé : 1699.2, trouvé : 1699.6.

EXEMPLE 5 : Synthèse du lipopeptide 21 (figure 5).

1) Synthèse de l'hydrazinopeptide 19.

L'hydrazinopeptide 19 a été synthétisé sur 0,25 mmol (357.1 mg) de
~~résine Rink Amide aminométhyl polystyrène comprenant 1% de divinylbenzène~~
15 (0,70 mmol/g, 100-200 Mesh, Senn Chemicals AG) en utilisant la stratégie Fmoc/*tert*-butyle telle que décrite par exemple par FIELDS *et al.* *Int. J. Pept. Protein*, 1990, 35, 161, et une activation HBTU/HOBt (SCHNÖLZER *et al.* *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, 40, 180), à l'aide d'un synthétiseur de peptides Applied Biosystem 431A (Foster City, USA). Les groupements protecteurs Fmoc sont éliminés à l'aide d'une
20 solution de pipéridine. A la fin de la synthèse, le groupement protecteur Fmoc de la fonction α -NH₂ de la lysine N-terminale est éliminé à l'aide d'une solution de pipéridine à 20% dans le DMF.

La fonction α -NH₂ ainsi déprotégée est modifiée en utilisant la
25 procédure de N-amination électrophile en phase solide mise au point par C. KLINGUER *et al.* (Tetrahedron Letters, 1996, 37, 40, 7259-7262). L'hydrazinopeptide obtenu est déprotégé et coupé de la résine en utilisant 10 ml d'une solution de TFA (94% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% thioanisole, 1% triisopropylsilane) pendant 1h30 sous agitation. Le composé est ensuite précipité dans 100 ml d'une
30 solution Et₂O/pentane 1/1. Après précipitation et élimination du surnageant, le culot est dissous dans de l'acide acétique à 10%, congelé est lyophilisé.

L'identité de l'hydrazinopeptide 19 est vérifiée par PDMS-TOF sur un Spectromètre de Masse à Désorption de Plasma Bio-ion 20. $[M+H]^+$ calculé : 895.5, observé : 895.9.

35 La purification de l'hydrazinopeptide 19 est réalisée sur une colonne préparative C3 Zorbax (30°C, détection à 235 nm, tampon A = H₂O 100%/TFA

0,05%, tampon B = alcool isopropylique 40%/H₂O 60%/TFA 0,05%, débit de 2 ml/minute, de 0 à 70% en B en 70 minutes). Après congélation et lyophilisation, l'hydrazinopeptide 19 est obtenu avec un rendement de 56%. La pureté du produit après lyophilisation est vérifiée par RP-HPLC dans les mêmes conditions

5 qu'indiquées précédemment.

2) Synthèse du lipopeptide 21.

5.06 mg d'hydrazinopeptide 19 sont dissous dans 791 µl de tampon citrate-phosphate pH 5.11. 1.1 eq. (4,12 µmol) de palmitate de succinimidyle 20 (Su représentant un groupe succinimidyle) dissous dans 791 µl de 'BuOH sont alors
10 ajoutés. Le suivi de la réaction est réalisé par RP-HPLC sur une colonne C3 Zorbax. Après 48 h, le milieu réactionnel est purifié sur colonne préparative C3 Zorbax (30°C, détection à 215 nm, tampon A = H₂O 100%/TFA 0,05%, tampon B = acétonitrile 80%/H₂O 20%/TFA 0,05%, débit de 3 ml/minute, de 0 à 70% en B en 70 minutes). Le
rendement en lipopeptide 21 est de 60%.

15 **EXEMPLE 6 : Synthèse des lipopeptides 23 et 24 (figure 6).**

1) Synthèse de l'hydrazinopeptide 22.

• Protocole de synthèse.

Le peptide 22 est élaboré sur une résine Fmoc-PAL-PEG-PS (0,16 mmol/g, Perseptive) selon la stratégie Fmoc/*tert*-butyle et une activation
20 HBTU/HOBt (voir l'exemple 2) sur un synthétiseur de peptides Pioneer-Perseptive. Les protections des chaînes latérales des acides aminés sont les suivantes : His(Trt), Asn (Trt), Glu(O^tBu), Arg(Pbf), Lys(Boc), Ser(^tBu). En fin de synthèse, le groupement Fmoc de la fonction α-NH₂ de l'alanine est éliminé en présence de pipéridine à 20% dans le DMF. L'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique (1,2 eq.) est
25 ensuite introduit manuellement en utilisant l'activation BOP *in situ* (BOP : 1,2 eq., DIEA : 3,6 eq. dans le DMF durant 20 minutes). La peptidyl-résine est lavée successivement avec du DMF, du dichlorométhane, puis de l'éther. Elle est ensuite séchée sous pression réduite pendant 30 minutes. La coupure du lien peptide-résine ainsi que la déprotection des chaînes latérales sont réalisées en présence d'un mélange
30 TFA/phénol/éthanedithiol/thioanisole/H₂O (1 g de résine sèche / 10 ml de TFA / 0,25 ml d'éthanedithiol / 0,25 ml d'H₂O / 0,25 ml de thioanisole / 0,75 g de phénol) sous agitation durant 3h30 à température ambiante. Le peptide est précipité dans 200 ml d'un mélange Et₂O/heptane (1/1) préalablement refroidi à 0°C. Le précipité est centrifugé puis dissous dans un mélange H₂O/AcOH (5/1), congelé et lyophilisé. On
35 obtient 263 mg de peptide brut à partir de 0,072 mmole de résine.

- Purification de l'hydrazinopeptide 22.

L'hydrazinopeptide 22 a été purifié par HPLC sur une colonne C3 Zorbax en utilisant un gradient linéaire de 0% à 50% en 70 minutes d'un mélange 0,05% TFA/eau/isopropanol (2/3) dans un mélange 0,05% TFA/eau. Le composé purifié (43 mg) est lyophilisé et stocké à -20°C. L'analyse de l'hydrazinopeptide 22 par ES-MS est la suivante : $[M+H]^+$ calculé : 4645.5, trouvé : 4645.7.

2) Synthèse des lipopeptides 23 et 24.

Les composés 7 et 10 sont préparés comme indiqué dans l'exemple 3. Les lipopeptides 23 et 24 sont obtenus, respectivement à partir des composés 7 et 10 et de l'hydrazinopeptide 22, selon la mode opératoire décrit précédemment pour la synthèse du lipopeptide 11. Ils ont été obtenus avec un rendement de 40% après purification.

L'analyse par ES-MS (Micromass Quatro II Electrospray Mass Spectrometer) donne les résultats suivants :

lipopeptide 23 : $[M+H]^+$ calculé : 4883.5, trouvé : 4883.7 ;
lipopeptide 24 : $[M+H]^+$ calculé : 5058.5, trouvé : 5059.0.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

- 1°) Utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique ou de l'acide N,N'-di(Boc)hydrazinoacétique pour fonctionnaliser un peptide par un
-
- 5 groupement α -hydrazinoacétique, soit au niveau de l'extrémité N-terminale dudit peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.
-

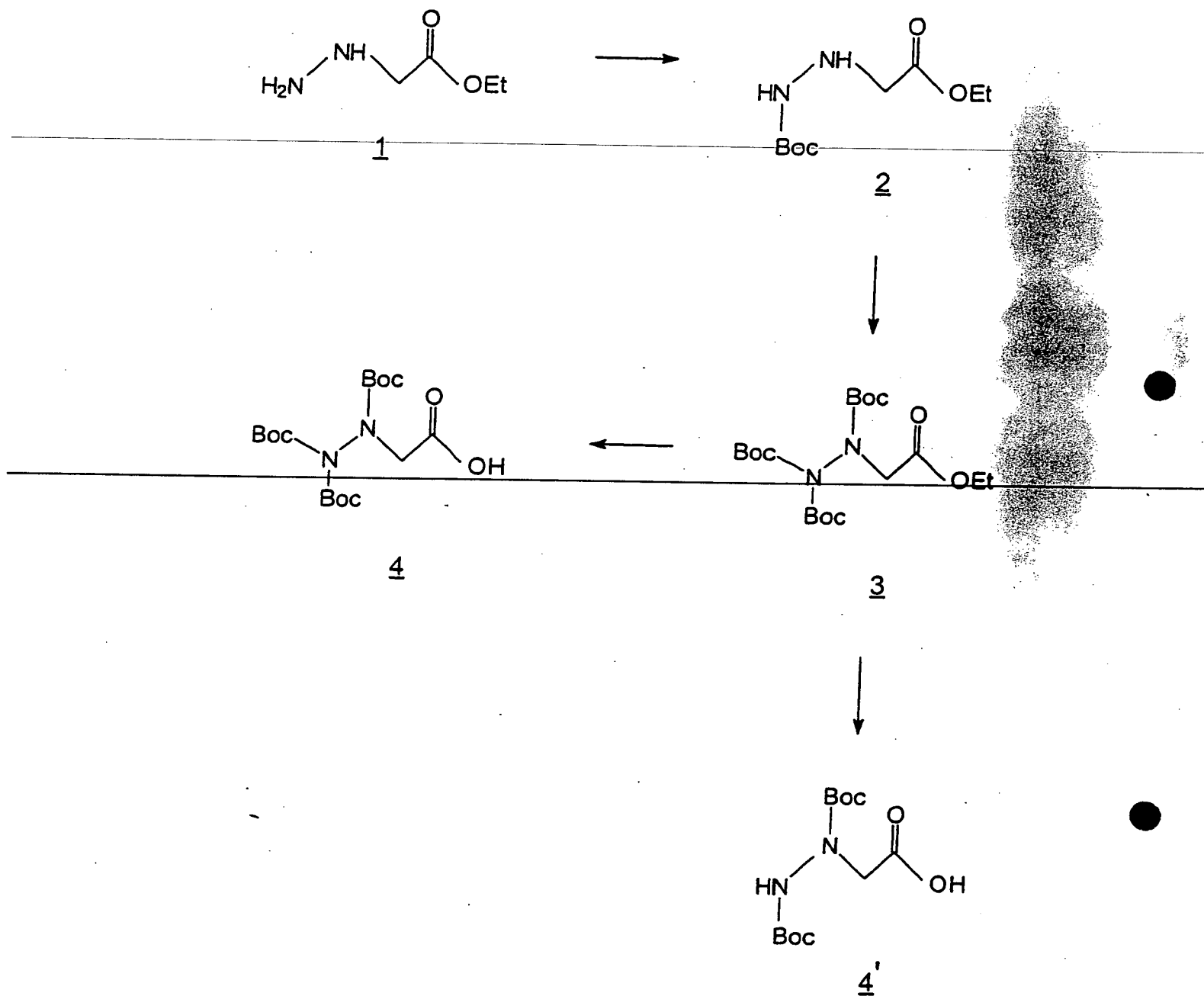
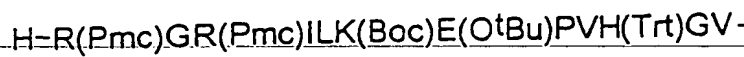
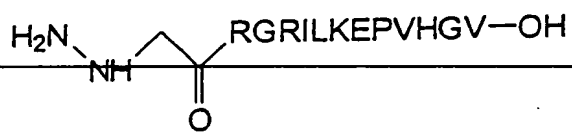


FIGURE 1



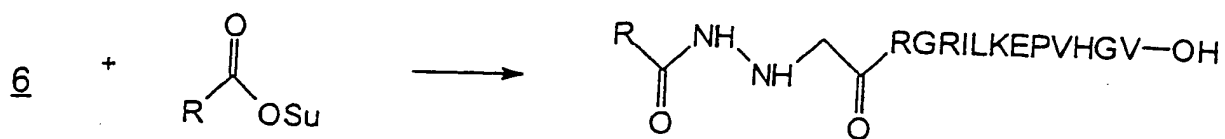
support solide

5



6

FIGURE 2



R =

7



11

8



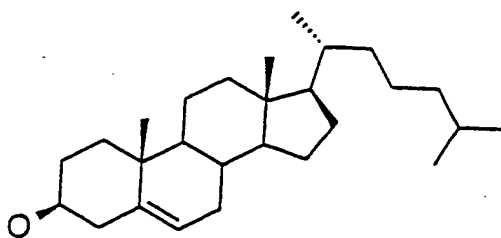
12

9



13

10



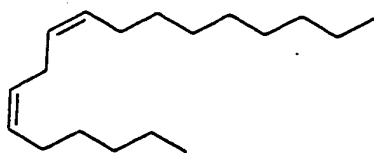
14

15



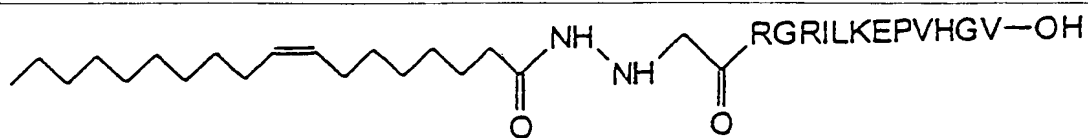
16

17

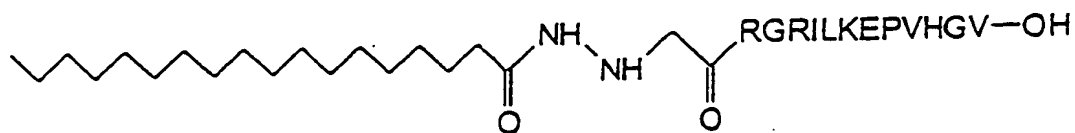


18

FIGURE 3



12



13

FIGURE 4

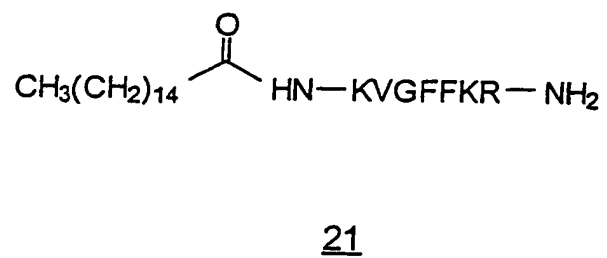
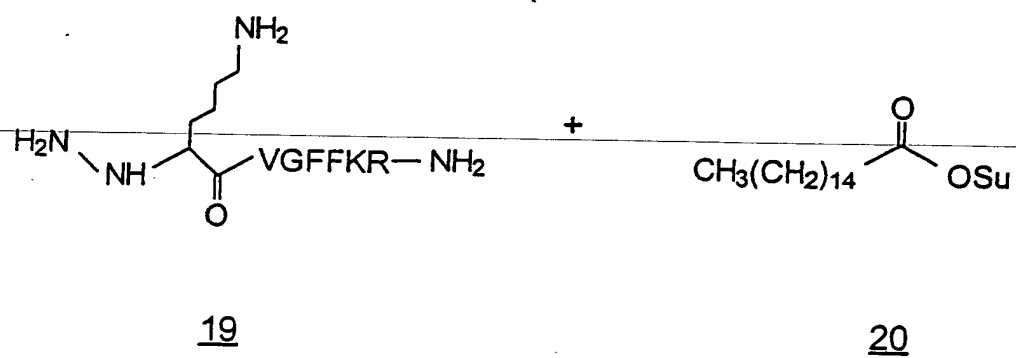
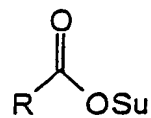


FIGURE 5



22

+

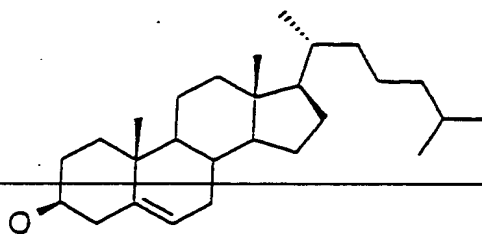


R =

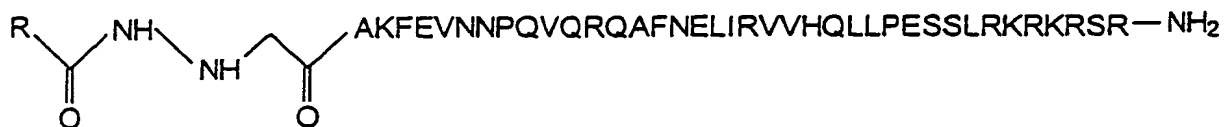


7

R =



10

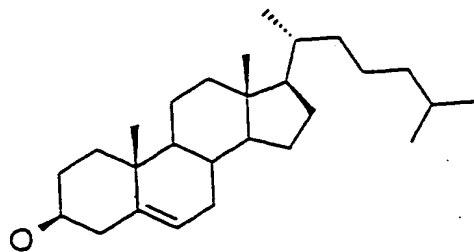


R =



23

R =



24

FIGURE 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)